

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-30678

⑪ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)2月8日

C 12 N 15/53

ZNA

7823-4B

//C 12 N 9/02

C 12 R 1:91)

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全11頁)

⑭ 発明の名称 ルシフェラーゼをコードするDNA化合物およびそれを含有する発現ベクター

⑮ 特 願 平1-167689

⑯ 出 願 平1(1989)6月29日

⑰ 発 明 者 フレデリック・一朗・ 大阪府吹田市春日4丁目11番3-107号  
辻

⑰ 発 明 者 長 田 重 一 大阪府吹田市佐井寺2丁目21番17-511号

⑰ 発 明 者 エリック・マルコム・ 大阪府吹田市春日4丁目11番3-204号  
トンプソン

⑰ 出 願 人 財団法人大阪バイオサイエンス研究所 大阪府吹田市古江台6丁目2番4号

⑰ 代 理 人 弁理士 青山 葆 外2名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

ルシフェラーゼをコードするDNA化合物およびそれを含有する発現ベクター

## 2. 特許請求の範囲

1. ウミボタルルシフェラーゼをコードするDNA化合物。

2. 請求項1記載のDNA化合物を含有する発現ベクター。

3. プラスミドpRSVVLである請求項2記載の発現ベクター。

4. 請求項2または3記載の発現ベクターを用いて宿主細胞をトランスフェクトし、培養することからなるウミボタルルシフェラーゼの製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

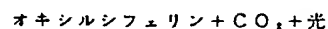
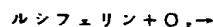
[産業上の利用分野]

本発明は、海洋性甲殻類であるウミボタル(*Vargula hilgendorfii*、以前は*Cypridina hilgendorfii*と分類されていた)の発光現象を触媒する酵素であるウミボタルルシフェラーゼをコードする

DNA化合物および該DNA化合物を含有する発現ベクター、並びに該発現ベクターを用いて適当な宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することからなるウミボタルルシフェラーゼの製造方法に関するものである。

[従来技術と発明が解決すべき課題]

ルシフェラーゼは様々な生物種で観察されている化学発光反応を触媒する酵素である。この発光反応は、酸素の存在下、基質ルシフェリンがルシフェラーゼの酵素作用によってオキシルシフェリンに酸化される反応であって、下記式で示される。



反応機構は生物種によって異なっており、補助因子としてATPなどのヌクレオチドを必要とするものもある。近縁種間では相互に反応し得ることも知られているが、基質特異性が極めて高く、同一種生物から得られたルシフェリンとルシフェラーゼとは反応するが、異種生物に由来する酵素と基質とは原則として、交差反応しないとされて

いる。

このようにルシフェラーゼの基質(ルシフェリン)特異性は極めて高く、その発光は鋭敏であることから、この酵素-基質の化学発光反応を利用して様々な物質の検出および/または定量を行うことができると考えられる。一般に酵素反応は、その基質特異性に起因して高感受性であり、かつ反応条件が温和であるために、様々な分野で応用されている。例えば、過酸化水素の存在下で酸化反応を触媒する西洋ワサビのペルキシダーゼは、極めて広範囲に利用されている酵素の1つである。とりわけ、この酵素は過酸化水素の発生を伴う反応を通じて検出し得る物質の分析には重要である。これ以外にも有用な酵素が抽出、単離されているが、様々な分野で、多様化する目的に応じて更に多くの利用可能な酵素が必要とされている。従って、発光反応を触媒する酵素であるルシフェラーゼを安定的に供給し得る方法が確立できれば、該酵素の新たな用途が開発されると考えられる。

ところでルシフェラーゼには、その触媒活性の

タルルシフェラーゼを遺伝子工学により製造することに着目し、該酵素をコードするcDNAをクローニングし、そのDNA配列を決定した。次いで、このようにして得たDNA化合物を含有する発現ベクターを構築し、該発現ベクターを哺乳類の細胞で発現させ、培地中にウミボタルルシフェラーゼを分泌させることに成功した。

即ち、本発明は、ウミボタルルシフェラーゼをコードするDNA化合物を提供するものである。

また、本発明は、該DNA化合物を含有する発現ベクターを提供するものである。

また本発明は、該発現ベクターを用いて宿主細胞をトランスフェクトし、培養して培地からウミボタルルシフェラーゼを回収することからなるウミボタルルシフェラーゼの製造方法を提供するものである。

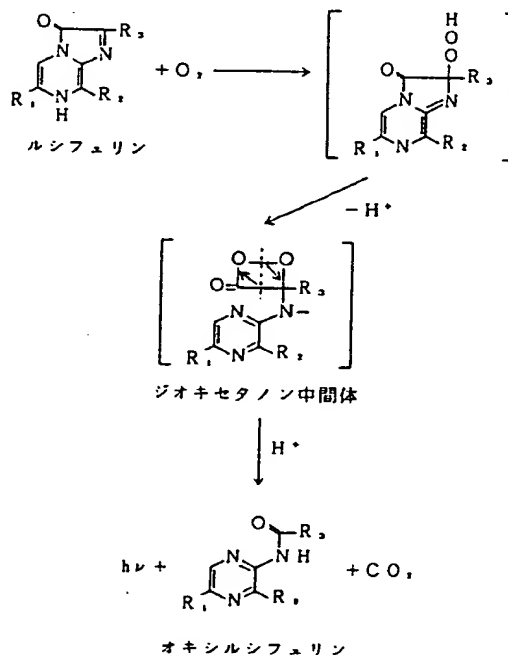
ウミボタルルシフェラーゼと基質ウミボタルルシフェリンの化学発光反応は十分に研究されている[ハーベィ(Harvey, E. N.), *Am. J. Physiol.* 42 318-341, 1917およびジョンソン(Johnson, F.

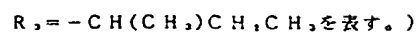
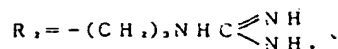
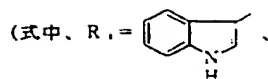
発現に、酸素およびルシフェリン以外の補助物質(微量のATPなどのヌクレオチド)を必要とするものと、必要としないものがある。前者に属するルシフェラーゼは補助物質(微量のATP)の検出などに利用されている。これに対して後者に属する酵素、例えばウミボタルルシフェラーゼは酸素と基質(この場合はウミボタルルシフェリン)以外の物質を必要としないことから、反応が単純であり、従って応用範囲が広く、有用性が高いと推測される。ウミボタルルシフェラーゼの応用分野の開発研究、並びに実用化を推進するためには、高純度のウミボタルルシフェラーゼが安定的に供給される必要がある。しかしながら、他の生物由来の酵素と同様に、生物からの酵素の抽出、単離および精製には、多くの時間と経費を要するので上記の需要を満たすことは困難である。従って、簡便かつ効率のよい、ウミボタルルシフェラーゼの製造方法の確立が望まれている。

[課題を解決するための手段]

本発明者らは、このような状況に鑑み、ウミボ

H.)ら、*Methods Enzymol.* 57 331-354, 1978]。その反応は下記の反応式で示される。





なお、λ<sub>max</sub> = 460 nmである。

ウミボタルルシフェラーゼのcDNAのスクリーニング、ヌクレオチド配列の決定、発現ベクターの構築、宿主細胞のトランスフェクションおよび培養は当該技術分野で既知の方法を用いて行なわれた。その概要を以下に示す。

文献[ツジ(Tsujii, F. I.) Methods Enzymol. (51, 364-372, 1978)]記載の方法で部分精製したウミボタルルシフェラーゼをアフィニティークラムを用いて完全に精製した。この標本を、そのままエドマン分解法に付した場合にはアミノ酸を帰属することができなかった。これはペプチドのN末端アミノ酸のアミノ基がブロックされていることを意味する。そこで、精製ウミボタルルシフェラーゼをエンドペプチダーゼで消化し、得られた

shita, K.)らによる J. Biol. Chem. (262, 3844-3851, 1987)の記載に準じてcDNAライブラリーを構築した。

このcDNAライブラリーを上記オリゴヌクレオチドプローブを用い、ブランクハイブリダイゼーション法[ベントンおよびディビス(Benton, W. D. & Davis, R. W.), Science 195, 180-182, 1977]でスクリーニングした。陽性を示す8個のクローンから2個のクローンVL16およびVL18を選択し、制限酵素地図を作成した。クローンVL16はルシフェラーゼのN-末端側を、VL18はC-末端側を夫々コードしており、互いに830ヌクレオチドの重複部分を有する(第2図bおよびc)。そこでこれらの2断片をEcoRI消化し、得られた断片をサブクローニングし、7-Deaza DNA配列決定キット(宝酒造)、および[α-<sup>32</sup>P]dCTP(222 TBq/mol)(New England Nuclear)を用いるジデオキシヌクレオチド鎖成長停止反応[サンガー(Sanger, F.)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463-5467,

ペプチド断片をエドマン分解法に付すことによりアミノ酸配列を決定した。次いで、適当な部分を用いてオリゴヌクレオチドプローブを設計し、DNA合成装置(Applied Biosystems Inc., Model 381A)を用い、ホスホラミタイト法(phosphoramidite method)[カルーサーズ(Caruthers, M. H.), Synthesis and Applications of DNA and RNA, 編集: ナラング(Narang, S. A.) (Academic Press, New York), pp. 47-94, 1987)]によりオリゴヌクレオチドプローブを合成した。

他方、千葉県で採集したウミボタル(ツジ、前掲)を液体窒素中で微粉末に粉砕し、この粉末をチオシアン酸グアニジン/塩化セシウム法[チグウィン(Chigwin, J. M.)ら、Biochemistry 18, 5294-5299, 1979]で処理して全細胞RNAを抽出した。次いで、オリゴ(dT)セルロースカラムクロマトグラフィ[アビブ(Aviv, H.)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 1408-1412, 1972]にかけてポリ(A)RNAを精製し、モリシタ(Mori

1977 およびチュン(Chen, E. Y.)ら、DNA 4, 165-170, 1985]によってヌクレオチド配列を決定した。完全長のcDNAの制限酵素地図を第2図aに、ヌクレオチド配列および推定のアミノ酸配列を第3図に示す。この推定のアミノ酸配列は上記のエドマン分解法で決定したアミノ酸配列と完全に一致していた。

次にクローンVL16およびVL18から構築した完全長のcDNAクローン(第2図d参照)を用いて発現ベクターを構築した。発現ベクターは原核性または真核性のいずれであってもよい。当業者にとっては、適当な出発物質としてのベクターを選択し、これに所望のペプチドをコードするDNA化合物を挿入し、該ペプチドの発現ベクターを構築する方法は周知である。本明細書では、生成物が培地に分泌されるために処理が容易であることから、哺乳類の細胞で発現可能な発現ベクターを例示した。本発明の例示ベクターであるブラズミドpRSVV1は、ウミボタルルシフェラーゼをコードするcDNAをラウス肉腫ウイルスの

ロングターミナルリピートのプロモーターの下流に含有している。このプラスミドpRSVVLを用い、常法通り宿主細胞をトランスフェクトする。トランスフェクションの方法および宿主細胞は適宜選択し得るが、本発明においては、リン酸カルシウム法(Graham, F. L.ら, Virology 52, 456-467, 1973 および Wigler, M.ら, Cell 14, 725-731, 1978)によりサルのCOS細胞[グルツマン(Glutman, Y.), Cell 23, 175-182, 1981, (7×10<sup>6</sup>)]をトランスフェクトした。ウミボタルルシフェラーゼの発現に適した培地でインキュベートした後、培地を回収し、細胞を収獲して細胞抽出物を調製した。

このようにして得られた培地および細胞抽出物のウミボタルルシフェラーゼ活性をMitchell-Hastings光度計により測定した[ミッチェル(Mitchell, G. W.)ら, Anal. Biochem. 39, 243-250]。その結果、細胞抽出物から検出されるウミボタルルシフェラーゼ活性は僅かであったが、培地からは明確なトランスフェラーゼ活性が検出された(第

4図)。この発光は極めて鋭敏であって、培地10μl中の5μlを用いバックグラウンドよりも明らかに高いシグナルが検出された。

このように、本発明によればウミボタルルシフェラーゼを遺伝子工学的に、容易に製造することができる。

本発明によりホタルルシフェラーゼをコードするDNA化合物のヌクレオチド配列が明らかにされたので、当業者は遺伝子工学における既知の手段を用いて容易にホタルルシフェラーゼを製造することができる。本発明のウミボタルルシフェラーゼをコードするDNA化合物の発現に適した発現ベクターの構築のための出発物質(プロモーター等を含む発現ベクター)および宿主細胞は多数知られており、本明細書に例示したプロモーター-宿主系以外の系を選択して本発明方法と同様の効果をあげることができる。当業者にとって、適当なプロモーター-宿主系を選択し、発現ベクターを構築し、得られた発現ベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、培養して生成物を単離する方

法は既知である。従って、当業者ならば、本発明が例示のプラスミド、pRSVVLに限定されるものではなく、本発明のウミボタルルシフェラーゼをコードするDNA化合物の発現に適したあらゆる発現ベクターを包含するものであるということ容易に理解するであろう。そのような他の発現ベクターに適するプロモーターとして、下記のことを挙げることができる。

即ち、動物細胞での発現のプロモーターとしては、サルSV40ウイルスプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、アデノウイルスプロモーター、AIDSウイルスプロモーター、痘多角形ウイルスプロモーターなどである。この際、マウスNIH 3T3細胞、C127細胞、L細胞、ハムスターCHO細胞、ヒトHeLa細胞や蚕などを宿主細胞として用いることができる。また、原核細胞での発現プロモーターとしては、λファージPLプロモーター、T<sub>ac</sub>プロモーター、T7プロモーター、lacプロモーターなどが知られており、大腸菌を宿主として発現させることができ

る。さらに、酵母や枯草菌を宿主として、それに適するプロモーターを使用して、ウミボタルルシフェラーゼを発現させることも可能である。

以下に実施例を示し、本発明をさらに詳細に説明する。

#### 実施例1 ウミボタルcDNAのクローニング

##### 1. ウミボタルルシフェラーゼの精製および配列決定

ツジ(Tsuji, F. I.)の方法[Methods Enzymol. (57, 364-372, 1978)]に従って部分精製したウミボタルルシフェラーゼを2.0M NaCl/0.07M Tris-HCl(pH 7.2)中で平衡させたトリプタミンアフィニティカラム(Pierce Chemical)を用い、30%エチレングリコール/0.17M NaCl/0.07M Tris-HCl(pH 7.2)で段階的に溶離した。次いで、限外濾過によって濃縮した後、p-アミノベンズアミジンアフィニティカラム(Pierce Chemical)を用い、同様のクロマトグラフィ条件下、均質になるまで精製した。

精製したウミボタルルシフェラーゼのドデシル

硫酸ナトリウム／勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。勾配10-15%ファストゲル(PhastGel)(Pharmacia)により試料を分析し、ファストゲル銀染色キット(Pharmacia)でタンパク質を観察すると、Mr68,000の一本の帯を示した。結果を第1図に示す。図中、レーン1はファルマシア製の低分子量マーカーであり、レーン2はアフィニティークロマトグラフィーで精製したウミボタルシフェラーゼ(5.0 ng)である。マーカータンパク質の分子量はキロダルトンで示されている。

精製したタンパク質120 µgを、トリプシン(Bioehringer-Mannheim)、リシルエンドペプチダーゼ(和光純薬)またはアルギニルエンドペプチダーゼ(宝酒造)によってエンドペプチダーゼ消化した。この消化物をC<sub>18</sub>-タンパク質-ペプチドHPLCカラム(Vydac)を用いる逆相クロマトグラフィーにかけ、各々のペプチド断片を分離した。次いで気相タンパク質シーケンセーター(Applied Biosystems Inc., Model 477A)を用いるエドマ

ン分解法によって、未消化のルシフェラーゼと精製ペプチドのN-末端アミノ酸配列を決定した。

## 2. mRNAの調製およびcDNAのライブラリーの構築

千葉県で採集したウミボタル(ツジ、前掲)を即座に液体窒素中で凍結させた。このウミボタル(オスタコッズ、ostacods)(重量5g)を、ウルトラクターラックスホモジナイザー(ultraturrax homogenizer)(Janke & Kunkel)を用い、液体窒素中で微粉砕した。この微粉末をチオシアン酸グアニジン／塩化セシウム法[チグウィン(Chigwin, J. M.)ら、Biochemistry 18, 5294-5299, 1979]に付して全細胞RNAを抽出した。次いで、オリゴ(dT)セルロースカラムクロマトグラフィー法[アビブ(Aviv, H.)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412, 1972]によってポリ(A)RNAを精製した。このmRNAを用いてcDNAライブラリーを構築したが、その際低融解アガロース(BioRad)を用いる2回の精製で二本鎖のEcoRI消化cDNAをサイズ選別する外は、モリシタ(M

orishita, K.)らの方法[J. Biol. Chem. (262, 3844-3851, 1987)]に従った。

## 3. cDNAクローンのスクリーニング

上記1.で調製したペプチドフラグメントの一部はコドンアンビギュイティが最小であるペプチド配列、Thr-Met-Glu-Asn-Leu-Asp-Gly-Gln-Lysを有していた。これを用い、コドン縮重性が高い3箇所にデオキシイノシンを含ませ[オーツカ(Ohtsuka, E.)ら、J. Biol. Chem. 260, 2605-2608, 1985]、下記の相補オリゴヌクレオチドプローブを設計した：

5' (T/C)TT(T/C)TGICC(A/G)TCIAGGTT(T/C)TCCATIGT3'

さらに、15位にGの代わりにAを有する第2の相補プローブを合成した。オリゴヌクレオチドプローブの合成はDNAシンセサイザー(Applied Biosystems Inc., Model 381A)により、ホスホラミダイト法[カルーサー(Caruthers, M. H.), Synthesis and Applications of DNA and RNA, Narang, S. A. 編, (Academic Press, New York), pp. 47-94, 1987]で行った。

このオリゴヌクレオチドプローブを、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造)および[γ-<sup>32</sup>P]ATP(222 TBq/μmol, New England Nuclear)を用いて5'末端標識し(比活性：5-6 × 10<sup>6</sup> cpm/μmol)、得られた2プローブの混合物を用いてブランクハイブリッド法[ベントンおよびディビス(Benton, W. D. & Davis, R. W.), Science 196, 180-182, 1977]により、上記2.で調製したウミボタルcDNAライブラリーをスクリーニングした。即ち、このプローブを用いて1 × 10<sup>6</sup>個の粗換えファージをスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、温度を28℃に下げ、フィルターを37℃でSSC(0.15M NaCl, 1.5 mMクエン酸ナトリウム, pH 7.0)により洗浄する外は、ウォール(Wahl, G. M.)らの方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA (76, 3683-3687, 1979)]に従って行われた。ライブラリーから8つの陽性クローンを分離し、その内、挿入長さ1.2 kbおよび1.5 kbのクローンVL16およびクローンVL18を選択してさらに分析し、

制限酵素地図を作成した。これらのクローンの制限酵素地図を第2図に示す。

#### 4. ウミボタルルシフェラーゼのヌクレオチド配列の決定

第2図bおよびcから分かるように、クローンV L 16およびクローンV L 18には夫々、単一の内部Eco R I部位があり、830個のヌクレオチド配列の重複部分がある。これらの両クローンのEco R I断片をpUC8でサブクローニングした。7-Deaza DNA配列決定キット(Takara Shuzo)を使用し、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  (222 T Bq/ $\mu\text{mol}$ ) (New England Nuclear)を用いるジデオキシヌクレオチド増成停止反応[サンガー(Sanger, F.)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5463-5467, 1977 および チェン(Chen, E. Y.)ら、DNA **4**, 165-170, 1985)]に付してヌクレオチド配列を分析した結果、クローンV L 16はルシフェラーゼのN-末端部分をコードし、クローンV L 18はC-末端部分をコードしていることがわかった。これらのクローンから構築さ

れた完全長のウミボタルルシフェラーゼcDNAの制限地図を第2図aに、ヌクレオチド配列および推定のアミノ酸配列を第3図に示す。第2図aにおいて、斜線部分は、推定のシグナル配列である。第3図において、各列の上に記した番号はヌクレオチド位置であり、各列の下に記した番号はアミノ酸位置である。水平方向の矢印は、エンドペプチダーゼ消化によって得られたアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を有する領域を表す。N-グリコシル化に適合する配列を四角で囲み、ポリ

アデニル化シグナルAATAAAを下線で示した。この配列から計算されるウミボタルルシフェラーゼの分子量は62,171ダルトンであり、555個のアミノ酸からなるタンパク質をコードする、1665個のヌクレオチドからなるオープンリーディングフレームを含んでいる。このオープンリーディングフレームには、オリゴヌクレオチドプローブの構築に用いたアミノ酸配列が含まれている。また、エドマン分解法によって決定した他の7個のペプチドのアミノ酸配列は、ヌクレオ

チド配列から推定されるアミノ酸配列と完全に一致していた。

翻訳開始コドン(16番目のヌクレオチド)から始まるATGコドンに当たった。この推定の開始コドンの周囲のヌクレオチド配列は、多くの真核生物のmRNAに特徴的なコンセンサス配列CC(A/G)CCAUGGと一致している[コザック(Kozak, M.), Cell **15**, 1109-1123, 1978]。N-末端のアミノ酸配列は、分泌タンパク質としてのルシフェラーゼの生物学的役割を果たすために、シグナル配列の特徴を多数有している[フォン・ハイネ(von Heijne, G.), Eur. J. Biochem. **133**, 17-21, 1983]。なお、ブロックされているN-末端は後述の方法で予想された。

過ヨウ素酸-シッフ反応によるルシフェラーゼ陽性染色によっても示されたが、アミノ酸残基186および408位に2つのN-グリコシル化部位(Asn-X-Ser/Thr)がある。残基258位には配列Asn-Pro-Serが存在しているが、一般にこの配列は効率良くグリコシル化されない[マー

シャル(Marshall, R. D.), Ann. Rev. Biochem. **41**, 673-702, 1972]。N-グリコシダーゼFを作らせるとルシフェラーゼ分子の大きさは2000-3000ダルトン減少するが、O-グリコシル化部位に特異的な消化酵素ではこのような減少は認められない。これらの結果は、ウミボタルルシフェラーゼがN-グリコシル化されること、ならびにヌクレオチド配列から推定されるポリペプチドの理論分子量と、ゲル電気泳動(第1図)およびゲル濾過と沈降平衡分析(ツジら、Biochemistry **13**, 5204-5209, 1974)で測定した天然タンパク質の分子量との差が炭水化物部分の非存在または存在に関連していることを示している。

アミノ末端は、ルシフェリンの構造および反応機構が類似している他の海洋生物の生物発光反応を触媒する酵素の構造から類推した。そのような生物としてクラゲ(*Aequorea victoria*)を選び、その生物発光反応と直接比較した[ジョンソン(Johnson, F. H.)ら、Methods Enzymol. **51**, 271-291, 1978]。

クラゲの発光は、カルシウム結合タンパク質、エクオリンによるものであって、このエクオリンがカルシウムイオンの存在下で励起されて発光する。エクオリンは、アポエクオリン(アポタンパク質)、コエレンテラジンおよび酸素分子の錯体であって、エクオリンがカルシウムイオンと結合すると、配座変化が起こり、タンパク質がオキシゲナーゼに転換され、次いで、分子内反応によりコエレンテラジンが酸化される。この反応における発光体はアポエクオリンに結合した励起状態のコエレンテラジンである[シモムラ(Shiomura, O.)ら、Tetrahedron Lett. No. 31, 2963-2965, 1973]。

ウミボタルとクラゲの生物発光反応の基質構造および機構は相互に類似しているが殆ど交差反応しない。しかしながら、両者のアミノ酸配列の比較から、ウミボタルシフェラーゼの2領域(残基97~154および残基353~411)のアミノ酸配列が、アポエクオリンの1領域(残基82~144)のアミノ酸配列と有意な類似性を示

ノ酸残基が分泌に必要なリーダーペプチドであり、ウミボタルシフェラーゼのN-末端が12番目のチロシンであることを示唆するものである(第3図参照)。さらに、アラニンと隣接アミノ酸残基との関係はシグナル配列の開裂部位に適合している[フォン・ハイネ(von Heijne, G.)ら、Eur. J. Biochem. 133, 17-21, 1983]。以上から、ペプチドの開裂部位は11位であり、アミノ末端はチロシンであると予想される。

ウミボタルシフェラーゼのアミノ酸配列のもう1つの特徴は、非常にシステインに富む領域がN-末端部分に存在することである。この領域ではアミノ酸残基39~82の間に9個のシステイン残基が認められる。しかしながら、ウミボタルシフェラーゼには遊離のスルフィド基が検出されなかった(ツジら、前掲)ことから、システイン残基はおそらく分子内のジスルフィド架橋結合を形成していると考えられる。

**実施例2** ウミボタルシフェラーゼを含有する発現ベクターの構築

すことが分かった(第5図参照)。第5図は、ウミボタルシフェラーゼ(a)とクラゲ(*Aequorea*)のエクオリン(b)とのアミノ酸配列の相同性を示す図であって、Dayhoffの突然変異データマトリックス[デイホッフ(Dayhoff, M. O.), Schwartz, R. M.ら、Atlas of Protein Sequence and Structure(National Biochemical Research Foundation, Washington, D. C.), Vol. 5, pp. 345-352, 1978]における同一残基を2つの点(:)で示し、類似アミノ酸を1つの点(・)で示したものである。番号は各タンパク質のN-末端からの位置を表す。アポエクオリン分子の大きさはウミボタルシフェラーゼの約1/3であり、189個のアミノ酸残基からなっており、ウミボタルシフェラーゼの類似領域の一方または両方が発光に関与していると予測される。

アポエクオリンの残基87~144に相当するウミボタルシフェラーゼの領域は残基97~154であり、明らかに10アミノ酸残基のシフトが認められる。このことは、最初の11個のアミ

完全長のウミボタルシフェラーゼのcDNAをラウス肉腫ウイルスのロングターミナルリピートのプロモーターの下に置いて発現ベクターを構築した。即ち、ウミボタルシフェラーゼcDNAの5'末端および3'末端に、それぞれHindⅢおよびBglⅡリンカー(宝酒造)を連結した。Dr. S. Subramaniから得たホタルシフェラーゼをコードするプラスミドpRSVL[ドゥエット(de Wet, J. R.)ら、Mol. Cell. Biol. 7, 725-737, 1987]をSmaⅠで消化し、BglⅡリンカーと連結した。次いで、HindⅢおよびBglⅡで切断して得た線状プラスミドと、上記cDNAのHindⅢおよびBglⅡ断片とを連結することにより、ホタルシフェラーゼcDNAの代わりにウミボタルシフェラーゼcDNAを含有するHindⅢ-BglⅡ断片を含有する発現プラスミドpRSVLを得た。このプラスミドで形質転換した大腸菌、Escherichia coli pRSVLは工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている(受託日:平成元年6月15日、受託番号:FERM

P-10782)。

**実施例3** プラスミドpRSVVLによるCOS細胞のトランスフェクションおよびウミボタルシフェラーゼの発現

1. トランスフェクション

10cmのペトリ皿に入れた10%ウシ胎児血清(Hyclone)を含有するダルベッコ(Dulbecco)の改良イーグル培地(白水)10μlにサルCOS細胞[グルツマン(Glutman, Y., Cell 23, 175-182, 1981; ATCC CRL 1650)]を播いた(7×10<sup>6</sup>)。この細胞を、リン酸カルシウム法[グラハム(Graham, F. L.)ら、Virology 52, 456-467, 1973およびウィグラー(Wigler, M.)ら、Cell 14, 725-731, 1978]を用い、実施例2で調製したプラスミドpRSVVL DNA 10μgでトランスフェクトした。48時間インキュベートした後、培地を回収し、細胞を収獲した。次いで、細胞を凍結および解凍を繰り返した後、遠心分離することによって細胞抽出物を調製した(deWet, J. R.ら、前掲)。

ング(Hastings J. W.)ら、J. Opt. Soc. Am. 53, 1410-1415, 1963]。その結果、トランスフェクトされたCOS細胞の細胞抽出物に僅かなルシフェラーゼ活性が検出された。しかし、COS細胞の培養培地には大量のルシフェラーゼ活性が検出された(第4図参照)。この培養培地からの発光は被検培地の容量に正比例しており、発光は極めて鋭敏であった。即ち、ウミボタルシフェラーゼ発現ベクターでトランスフェクトされたCOS細胞の培養培地10μlから得た僅か5μlの試料から、バックグラウンドよりも明らかに高いシグナルが検出された。これに対して、DNAをトランスフェクトしていないCOS細胞の培養液かまたはpSVOCAT[ゴーマン(Gorman, C. M.)ら、Mol. Cell. Biol. 2, 1044-1051, 1982]もしくはpRSVL[ドゥウェット(deWet, J. R.)ら、Mol. Cell. Biol. 7, 725-737, 1987]でトランスフェクトされたCOS細胞の培地および細胞抽出物からの発光は、第4図記載の発光よりも2桁以上弱かった。

2. ウミボタルシフェラーゼ活性の測定

1. で調製した細胞抽出物および培地のウミボタルシフェラーゼ活性を、ウミボタルシフェリンを基質として測定した。

容量20μlのシンチレーションバイアル中、上記1. で得た培地あるいは細胞抽出物を、200mM Tris-HCl(pH 7.6)により希釈して全量を1.5μlとし、Mitchell-Hastings光度計に入れた[ミッチェル(Mitchell, G. W.)ら、Anal. Biochem. 39, 243-250, 1971]。他方、フジの方法[Methods Enzymol. 57, 364-372, 1978]に従って調製したウミボタルシフェリンを200mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.8)に溶解(濃度50mM)し、その1.5μlをシンチレーションバイアルに注入した。ルシフェリンを注入する直前に光度計のシャッターを開放し、注入した点を0minとし、1.5min後にシャッターを閉じ、その間の発光を記録した。

<sup>14</sup>C-ヘキサデカン光を標準として光度測定し、光度を1秒当たりの光子数に変換した[ハッシン

以上の結果は、再構成されたcDNAが完全長のウミボタルシフェラーゼcDNAであること、そのcDNAがタンパク質を分泌するのに必要なシグナル配列をもコードしていることを示すものである。

[作用]

本発明のウミボタルシフェラーゼをコードするDNA化合物を用いて所望の宿主内でホタルシフェラーゼを発現させることができる。ウミボタルシフェラーゼとウミボタルシフェリンとの化学発光反応は酵素分子のみを必要とする単純な反応である。しかし基質特異性が高く、発光の測定感度は鋭敏である。しかも、実施例に示すように、本発明の発現ベクターでトランスフェクトされたCOS細胞は、ウミボタルシフェラーゼを培養培地に分泌することから、生成物の回収が極めて容易である。これらの事実は、本発明のウミボタルシフェラーゼをコードするDNA化合物の有用性を明確に示すものである。従って、本発明のDNA化合物は生物医学の分野に限らず、



特許出願人 財団法人 大阪バイオサイエンス研究所

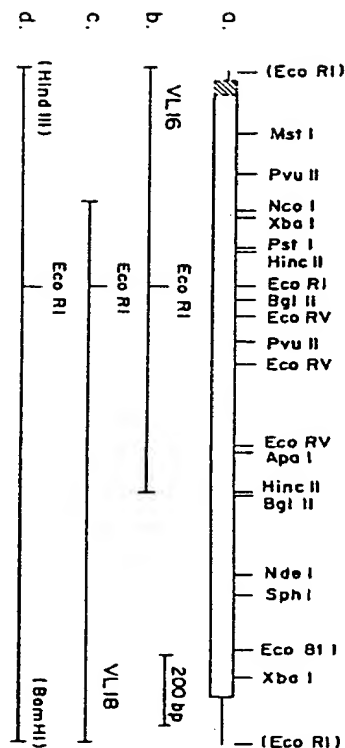
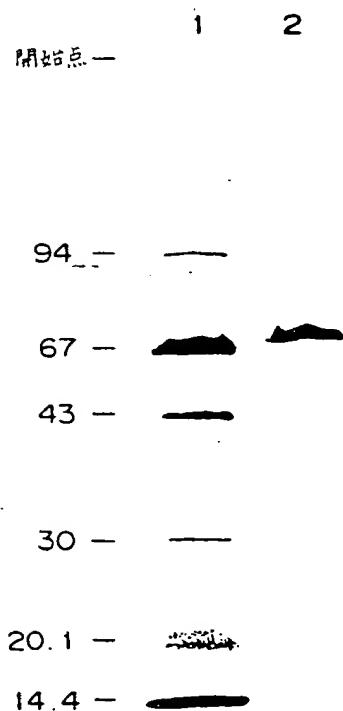
代理人 弁理士 青 山 稔 (外2名)

環境を始め、様々な分野で有用と思われる。

## 4. 図面の簡単な説明

第1図は、精製したウミボタルルシフェラーゼのドデシル硫酸ナトリウム／勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を表す写真の模写図である。第2図は、ウミボタルルシフェラーゼcDNAの制限酵素地図および全長クローンの構築に用いたクローンの制限酵素地図である。(a)は完全長のウミボタルルシフェラーゼcDNA、(b)はクローンVL16、(c)はクローンVL18の制限酵素部位を示す制限酵素地図であり、(d)はクローンVL16およびVL18から構築された完全長cDNAの制限酵素地図である。第3図は、ウミボタルルシフェラーゼcDNAのスクレオチド配列および推定のアミノ酸配列を示す模式図である。第4図は、COS細胞によって合成され分泌されたウミボタルルシフェラーゼの活性の測定結果を示すグラフである。第5図はウミボタルルシフェラーゼ(a)とクラゲのエクオリン(b)アミノ酸配列の相同性を示す模式図である。

第 1 図



第 2 図

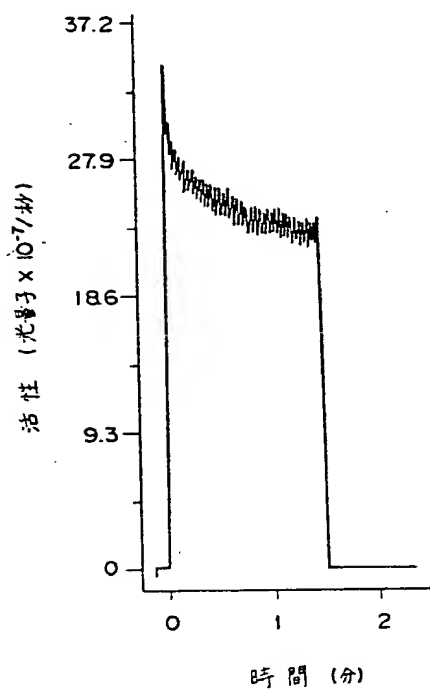
## 第3図(a)

10 GAAACCGACACCACT 30 ATG AAG ATA ATA ATT CTC TCT GTT ATA TTG GGC TAC TGT CTC ACC GAC AAC TGT CAA CAT CCA TGT CCT GTA GAA 90  
 Met Lys Ile Ile Ile Leu Ser Val Ile Leu Ala Tyr Cys Val Thr Asp Asn Cys Gln Asp Ala Cys Pro Val Glu  
 110 CCG GAA CCG CCA TCA AGT ACA CCA ACA CTT CCA ACT TCT TGT GAA GCT AAA GAA GCA GAA TGT ATA GAT ACC AGA TCC CCA ACA TGT AAA 170  
 Ala Glu Pro Pro Ser Ser Thr Pro Thr Val Pro Thr Ser Cys Glu Ala Lys Glu Gly Glu Cys Ile Asp Thr Arg Cys Ala Thr Cys Lys  
 190 CCA GAT ATA CTA TCA GAT GCA CTG TGT GAA AAT AAA CCA GCG AAG ACA TCC TGT AGA ATG TCC CAG TAT GTG ATT GAA TCC ACA GTA GAA 270  
 Arg Asp Ile Leu Ser Asp Gly Leu Cys Glu Asn Lys Pro Gly Lys Thr Cys Cys Arg Met Cys Gln Tyr Val Ile Glu Cys Arg Val Glu  
 290 GCA CCT GGT TAT TTT AGA ACG TTT TAC GGC AAA AGA TTT AAT TTT CAG CAA CCT GGT AAA TAT CTC CTC GCT AGG CCA ACC AAG GCT GCT 350  
 Ala Ala Gly Tyr Phe Arg Thr Phe Tyr Gly Lys Arg Phe Asn Phe Gln Glu Pro Gly Lys Tyr Val Leu Ala Arg Gly Thr Lys Gly Gly  
 370 GAT TGG TCT CTA ACC CTC ACC ATG CAG AAT CTA GAT GCA CAG AAG GCA GCT GTG CTC ACT AAG ACA ACA CTC GAG GTT CCA CCA CAC GTA 450  
 Asp Tyr Ser Val Thr Leu Thr Met Glu Asn Leu Asp Gly Gln Lys Glu Ala Val Leu Thr Lys Thr Thr Leu Glu Val Ala Gly Asp Val  
 470 ATA CAC ATT ACT CCA CCT ACT GCA CAT CCT ATC ACA GTT AAC GCA GCA GCT CAC CCA CTT ATT CCT AAC CCC TTC ACA ATT GGT CAG CTC 530  
 Ile Asp Ile Thr Glu Ala Thr Ala Asp Pro Ile Thr Val Asn Gly Gly Ala Asp Pro Val Ile Ala Asn Pro Phe Thr Ile Gly Glu Val  
 550 ACC ATT GCT GTT GAA ATA CCG GGC TTC AAT ATC ACA GTC ATC CAA TTC TTT AAA CTA ATC GTG ATT GAT ATT CTC GGA CCA ACA TCT 630  
 Thr Ile Ala Val Val Glu Ile Pro Gly Phe Asn Ile Thr Val Ile Glu Phe Phe Lys Leu Ile Val Ile Asp Ile Leu Gly Gly Arg Ser  
 650 GTG ACA ATT GCT CCA CAC ACA CCA AAC AAA GGA CTC ATA TCT GGT ATC TGT GGT AAT CTC GAG ATG AAT GAC GCT GAT GAC TTT ACT ACA 710  
 Val Arg Ile Ala Pro Asp Thr Ala Asn Lys Gly Leu Ile Ser Gly Ile Cys Gly Asn Leu Glu Met Asn Asp Ala Asp Asp Phe Thr Thr  
 730 GAT GCA GAT CAG CTC GCG ATC CAA CCC AAC ATA AAC AAA GAG TTC GAC GCG TCC CCA TTC TAT GCG AAT CCT TCT GAT ATC GAA TAC TCC 810  
 Asp Ala Asp Gln Leu Ala Ile Gln Pro Asn Ile Asn Lys Glu Phe Asp Gly Cys Pro Phe Tyr Gly Asn Pro Ser Asp Ile Glu Tyr Cys  
 830 AAA GGT CTC ATG GAG CCA TAC AGA CCT GTA TGT CTT AAC AAT ATC AAC TTC TAC TAT TAC ACT CTA TCC TGT GCT TTC GCT TAC TGT ATG 890  
 Lys Gly Leu Met Glu Pro Tyr Arg Ala Val Cys Arg Asn Asn Ile Asn Phe Tyr Tyr Thr Thr Leu Ser Cys Ala Phe Ala Tyr Cys Met  
 910 GGA GGA GAA GAA AGA GCT AAA CAC GTC CTT TTC GAC TAT GTT GAG ACA TGC GCT GCG CCG GAA ACG AGA GGA ACG TGT GTT TTA TCA GGA 990  
 Gly Gly Glu Glu Arg Ala Lys His Val Leu Phe Asp Tyr Val Glu Thr Cys Ala Pro Glu Thr Arg Gly Thr Cys Val Leu Ser Gly  
 1010 CAT ACT TTC TAT GAC ACA TTC GAC AAA GCA AGA TAT CAA TTC CAG GGC CCA TGC AAG GAG ATT CTG ATG GCC GCA GAC TGT TAC TGG AAC 1070  
 His Thr Phe Tyr Asp Thr Phe Asp Lys Ala Arg Tyr Gln Phe Gln Gly Pro Cys Lys Glu Ile Leu Met Ala Ala Asp Cys Tyr Trp Asn  
 1090 ACA TGG GAT GTA AAG GTT TCA CAT AGA GAC GTC GAA TCA TAC ACT CAG GCA GAG AAA GTA ACA ATC AGG AAA CAG TCA ACT GTA GTA GAT 1170  
 Thr Trp Asp Val Lys Val Ser His Arg Asp Val Glu Ser Tyr Thr Glu Val Glu Lys Val Thr Ile Arg Lys Gln Ser Thr Val Val Asp  
 1190 CTC ATT GTG GAT GGC AAG CAG GTC AAG GTT GGA GGA GTG GAT GTA TCT ATC CCG TAC AGC TCT GAG AAC ACT TCC ATA TAC TGG CAG GAT 1250  
 Leu Ile Val Asp Gly Lys Gln Val Lys Val Gly Val Asp Val Ser Ile Pro Tyr Ser Ser Glu Asn Thr Ser Ile Tyr Trp Glu Asp  
 1270 GGA GAC ATC CTG ACG ACG GCC ATC CTA CCT GAA GCT CTT GTC GTT AAG TTC AAC TTT AAG CAG CTC CTT GTA GTT CAT ATC AGA GAT CCA 1350  
 Gly Asp Ile Leu Thr Thr Ala Ile Leu Pro Glu Ala Leu Val Val Lys Phe Asn Phe Lys Gln Leu Leu Val Val His Ile Arg Asp Pro  
 1370 TTC GAT GGA AAG ACA TGC GGC ATA TGT GGT AAC TAT AAT CAA GAT TCA ACT GAT GAT TTC TTT GAC GCA GAA GGA GCA TCC GCT CTA ACC 1430  
 Phe Asp Gly Lys Thr Cys Gly Ile Cys Gly Asn Tyr Asn Gln Asp Ser Thr Asp Asp Phe Phe Asp Ala Glu Gly Ala Cys Ala Leu Thr  
 1450 CCC AAC CCC CCA GGA TGT ACA GAG GAA CAG AAA CCA GAA GCT CAG CCA CTT TCC AAT AAT CTC TTT GAT TCT TCT ATC GAC GAG AAA TCT 1530  
 Pro Asn Pro Pro Gly Cys Thr Glu Glu Gln Lys Pro Glu Ala Glu Arg Leu Cys Asn Asn Leu Phe Asp Ser Ser Ile Asp Glu Lys Cys  
 1550 AAT GTC TGC TAC AAG CTT GAC CCG ATT GCC CCA TGT ATG TAC GAG TAT TGC CTC AGG GGA CAA CAA GGA TTT TGT GAT GAT GCT TGG GAG 1610  
 Asn Val Cys Tyr Lys Pro Asp Arg Ile Ala Arg Cys Met Tyr Glu Tyr Cys Leu Arg Gly Gln Gln Gly Phe Cys Asp His Ala Trp Glu  
 1630 TTC AAG AAA GAA TGC TAC ATA AAA CAT CCA GAC ACT CTA GAA GTA CCA CCT GAA TGT CAA TAA ACGTACAAAGATACAGAACTAAGCTACTACAGC 1710  
 Phe Lys Lys Glu Cys Tyr Ile Lys His Gly Asp Thr Leu Glu Val Pro Pro Glu Cys Gln End  
 1730 AGAAGATAAAAAAGAACTCTAGTTCTTCAAAAAACCGTGTATTTTATCTACTATTGTTAATTAGAGGAAATAAATGTTTATTATCATACTTAAAGTAAAAAAGAAAAA 1830

## 第3図(b)

910 GGA GGA GAA GAA AGA GCT AAA CAC GTC CTT TTC GAC TAT GTT GAG ACA TGC GCT GCG CCG GAA ACG AGA GGA ACG TGT GTT TTA TCA GGA 990  
 Gly Gly Glu Glu Arg Ala Lys His Val Leu Phe Asp Tyr Val Glu Thr Cys Ala Pro Glu Thr Arg Gly Thr Cys Val Leu Ser Gly  
 1010 CAT ACT TTC TAT GAC ACA TTC GAC AAA GCA AGA TAT CAA TTC CAG GGC CCA TGC AAG GAG ATT CTG ATG GCC GCA GAC TGT TAC TGG AAC 1070  
 His Thr Phe Tyr Asp Thr Phe Asp Lys Ala Arg Tyr Gln Phe Gln Gly Pro Cys Lys Glu Ile Leu Met Ala Ala Asp Cys Tyr Trp Asn  
 1090 ACA TGG GAT GTA AAG GTT TCA CAT AGA GAC GTC GAA TCA TAC ACT CAG GCA GAG AAA GTA ACA ATC AGG AAA CAG TCA ACT GTA GTA GAT 1170  
 Thr Trp Asp Val Lys Val Ser His Arg Asp Val Glu Ser Tyr Thr Glu Val Glu Lys Val Thr Ile Arg Lys Gln Ser Thr Val Val Asp  
 1190 CTC ATT GTG GAT GGC AAG CAG GTC AAG GTT GGA GGA GTG GAT GTA TCT ATC CCG TAC AGC TCT GAG AAC ACT TCC ATA TAC TGG CAG GAT 1250  
 Leu Ile Val Asp Gly Lys Gln Val Lys Val Gly Val Asp Val Ser Ile Pro Tyr Ser Ser Glu Asn Thr Ser Ile Tyr Trp Glu Asp  
 1270 GGA GAC ATC CTG ACG ACG GCC ATC CTA CCT GAA GCT CTT GTC GTT AAG TTC AAC TTT AAG CAG CTC CTT GTA GTT CAT ATC AGA GAT CCA 1350  
 Gly Asp Ile Leu Thr Thr Ala Ile Leu Pro Glu Ala Leu Val Val Lys Phe Asn Phe Lys Gln Leu Leu Val Val His Ile Arg Asp Pro  
 1370 TTC GAT GGA AAG ACA TGC GGC ATA TGT GGT AAC TAT AAT CAA GAT TCA ACT GAT GAT TTC TTT GAC GCA GAA GGA GCA TCC GCT CTA ACC 1430  
 Phe Asp Gly Lys Thr Cys Gly Ile Cys Gly Asn Tyr Asn Gln Asp Ser Thr Asp Asp Phe Phe Asp Ala Glu Gly Ala Cys Ala Leu Thr  
 1450 CCC AAC CCC CCA GGA TGT ACA GAG GAA CAG AAA CCA GAA GCT CAG CCA CTT TCC AAT AAT CTC TTT GAT TCT TCT ATC GAC GAG AAA TCT 1530  
 Pro Asn Pro Pro Gly Cys Thr Glu Glu Gln Lys Pro Glu Ala Glu Arg Leu Cys Asn Asn Leu Phe Asp Ser Ser Ile Asp Glu Lys Cys  
 1550 AAT GTC TGC TAC AAG CTT GAC CCG ATT GCC CCA TGT ATG TAC GAG TAT TGC CTC AGG GGA CAA CAA GGA TTT TGT GAT GAT GCT TGG GAG 1610  
 Asn Val Cys Tyr Lys Pro Asp Arg Ile Ala Arg Cys Met Tyr Glu Tyr Cys Leu Arg Gly Gln Gln Gly Phe Cys Asp His Ala Trp Glu  
 1630 TTC AAG AAA GAA TGC TAC ATA AAA CAT CCA GAC ACT CTA GAA GTA CCA CCT GAA TGT CAA TAA ACGTACAAAGATACAGAACTAAGCTACTACAGC 1710  
 Phe Lys Lys Glu Cys Tyr Ile Lys His Gly Asp Thr Leu Glu Val Pro Pro Glu Cys Gln End  
 1730 AGAAGATAAAAAAGAACTCTAGTTCTTCAAAAAACCGTGTATTTTATCTACTATTGTTAATTAGAGGAAATAAATGTTTATTATCATACTTAAAGTAAAAAAGAAAAA 1830

第 4 図



第 5 図

```

100      120      140
a. KRFPQEPGKYVLARGTKGGDWSVTLTMTENLDGQKGAVLTKTTLLEVAGDVIDITQATAD
   . . . . .
b. KKLATDELEKYAKNEPTLIRIWGDAL-FDIVDKDQNGAITLDEWKAYTKAAGIIQSSSED
   90      110      130

360      380      400
a. YWNTWDVKVSHRDVESYTEVEKVTIRKQSTVVDLIVDGKQVKVGGVDVSIPIYSSENTSII
   . . . . .
b. YIEGWK-KLATDELEKYAKNEPTLIRIWGDALFDIVDKDQNGAITLDEWKAYTKAAGII
   90      110      130

```

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**